

土壌細菌の平板計数法に関する研究

著者	石栗 秀
号	354
発行年	1986
URL	http://hdl.handle.net/10097/16548

氏 名(本籍)	いし 栗 秀
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 354 号
学位授与年月日	昭和 61 年 9 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻
学 位 論 文 題 目	土壌細菌の平板計数法に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 服 部 勉 教授 伊 崎 和 夫

助教授 菊 本 敏 雄

論文内容要旨

平板計数法は土壤中の細菌数推定法の手段として広く用いられている。しかし、その計数値の解析方法は未だ十分には検討されておらず、或る時間断面における並列平板間の計数値の変動に関する検討がFisherらにより報告されているが、培養時間との関係など、未検討の問題が多数残されている。そのために、細菌の実験において、この方法はその真価を十分には発揮できないというのが現状である。

本研究は、平板上に出現するコロニー数の経時的観察を通して平板計数値の解析方法の基礎を築くことを目的とする。第1章では、大腸菌を用いて、培養時間と出現コロニー数の関係を検討し、第2章では幾つかの細菌集団から構成されていると考えられている土壤中の細菌群のコロニー形成過程が、第1章で得た関係を基礎に解析できることを示し、第3章では、平板計数値の変動の問題を、培養時間との関係に注目して検討する。

第1章 コロニー形成曲線の基礎的検討

平板上のコロニー数は培養時間に伴い増加する(図1)。各々のコロニーが一度にすべてが出現してこないのは、培養開始から各コロニー出現までの時間には、或る平均的な時間があるものの、各々のコロニー出現までの時間は種々の原因により、この平均値の前後にずれるためと考えられる。この場合、単位時間あたりに出現するコロニー数は、先の平均値の回りに集中することが期待される(図2)。この推測を検討する目的で、大腸菌を用いて短い時間間隔毎に、出現してくるコロニー数の計数を行った。

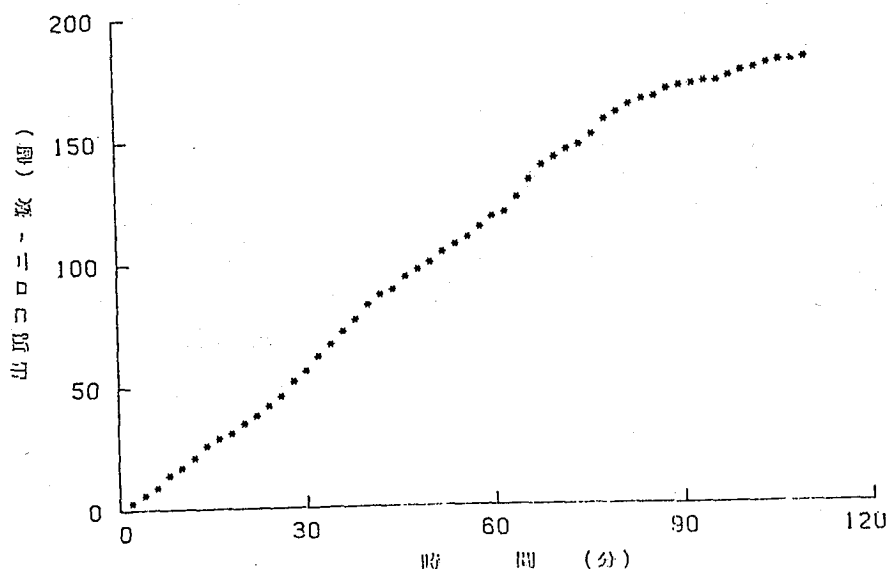


図1 培養時間に伴うコロニー数の増加

上記の推測によれば、図2のような結果が期待される。しかし、得られた結果は、計数初期では出現コロニー数は或る一定の値の回りで変動し、その後は徐々に減少するという結果であった(図3-1)。同様な実験を15回繰り返したが、図2に示したと同様な結果は一度も得られなかった。

次に、計数初期に注目し、更に短い時間間隔で出現コロニー数を計数した。その結果、一定時間間隔毎の出現コロニー数は或る一定の値の回りで不規則(ランダム)に変動することが見出された(図3-2)。解析の結果、これらのコロニー数の分布はPoisson分布に従っていることが確認された。同様なランダムな変動は10回の反復すべてに共通して観察された。

以上の結果をもとに、培養時間と平板上の出現コロニー数の関係式として、次式を導いた。

$$N(t) = N_{\infty} \{1 - \exp[-\lambda(t - t_r)]\} \quad (t \geq t_r)$$

$N(t)$: 培養時間 t における平板上のコロニー数。 N_{∞} : 無限時間培養を続けた時に平板上に出現済であるコロニー数。 λ : 単位時間あたりに、細胞が増殖を開始する確率。 t_r : 細胞が増殖を開始してから、眼に見えるコロニーを形成するまでの遅滞時間、なお t_r は細菌の増殖速度を反映しているものと考えられる。この式は化学反応速度論における一次反応式に

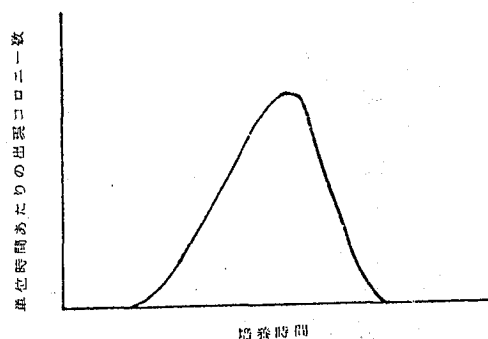


図2 単位時間あたりの出現コロニー数の変動

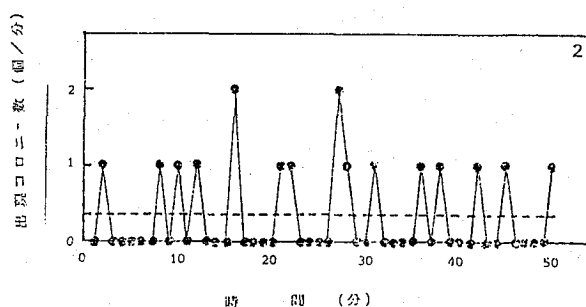
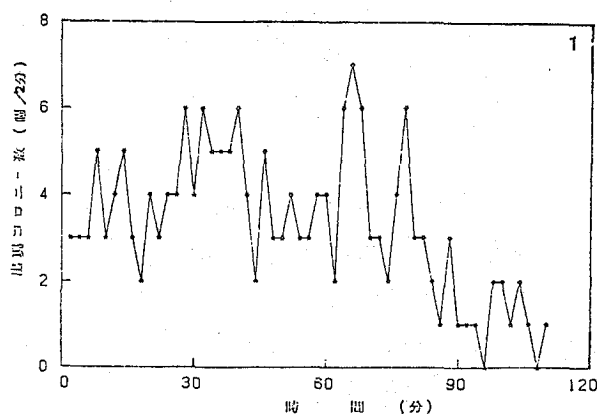


図3 単位時間あたりに出現するコロニー数の変動。破線：単位時間あたりに出現するコロニー数の平均値
1: 2分毎, 2: 1分毎の計数値

対応するもので、First Order Reaction (FOR)モデルと呼ばれる。

大腸菌及び、土壌からの単離菌株271株について、培養時間と出現コロニー数の関係を検討したところ、いずれもFORモデルに良く当てはまることが確認された。大腸菌の計数結果に対するFORモデル当てはめの例を図4に示した。

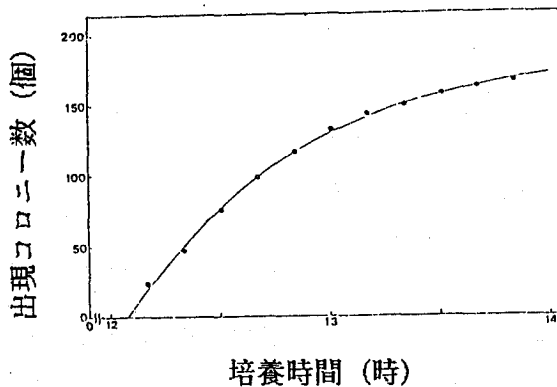


図4 大腸菌のコロニー計数値に対するFORモデルのあてはめ

第2章 土壌中の細菌のコロニー形成曲線の解析

畑や水田土壌中の細菌群は、多様な細菌種から構成されている。このような細菌群のコロニーが平板上に出現してくる過程を観察した結果、数段の階段状のコロニー形成(CF)曲線が得られた(図5)。この結果は畑土壌の団粒内部・外部、及び採取時期の異なる水田土壌にも共通して観察された。

図5の数段のCF曲線は、それぞれ増殖速度の異なる細菌群の存在を反映しているのではないかと考え、次の実験を行った。すなわち、畑土壌・水田土壌の各々についてCF曲線の各階段に対応するコロニーから細菌を百数十株ずつ単離し、その純粋培養を行った。こうして得られた細菌を平板上に接種・培養してそのコロニー出現過程を追跡し、単離菌株各々について、パラメーター $\lambda \cdot tr$ を推定した。このようにして得られた tr の分布をGram-Charlier 展開により検討した結果、単離菌株の tr は2つ(畑)ないし3つ(水田)のグループに分かれることが認められた。更に、各グループの tr はCF曲線の立ち上がりの位置に集中する傾向が見られた(図6)。すなわち、元の平板のCF曲線の或る1段を構成する細菌群の tr は、そのコロニーの最初の出現時間とは関係なく、単離された後はそのグループの立ち上がり点(CF曲線の tr 値)に集中することが見出された。

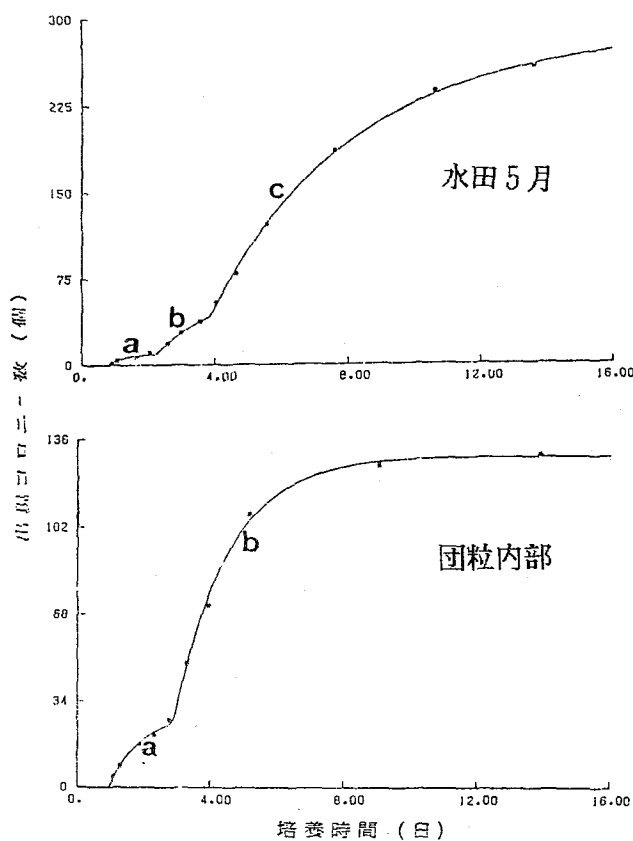


図5 土壌中の細菌のコロニー形成曲線

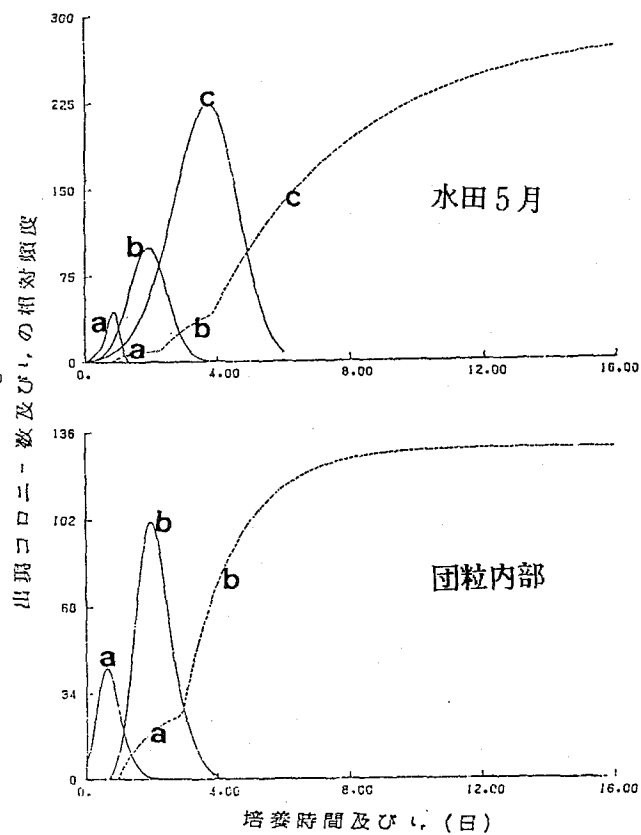


図6 土壌中の細菌のコロニー形成曲線と単離菌株のtの関係

表1 NB菌群の占める比率

		NB/Total	NB(%)
水田5月	a	47/ 59	79.7
	b	3/ 30	10.0
	c	2/ 44	4.5

単離した各細菌のtrと平均世代時間($\ln 2$ /増殖速度)の間には明瞭な直線関係が得られ(図7)、パラメーターtrは細菌の増殖速度を反映していることが明らかになった。

以上の結果より、土壤中の細菌群はその増殖速度の違いにより幾つかのグループに分けられることが示された。なお、このグルーピングは表1に示すように、NB細菌の構成とも密接に関連しており、各段のCF曲線より土壤中の細菌群の類別とその量比を推定することができると思われる。

第3章

平板計数値の変動の解析

並列平板上に出現するコロニー数は、平板毎に大きく変動する。この並列平板間での計数値の変動を解析する手法としてFisherは χ^2 指標を提唱した。しかし、Fisherは或る時間断面に於ける計数値の

扱いにとどまった。本章ではFisherの χ^2 指標に加えて、第1章で導いたFORモデルを基礎として、平板計数値の変動の問題を培養時間との関係を重視して検討する。

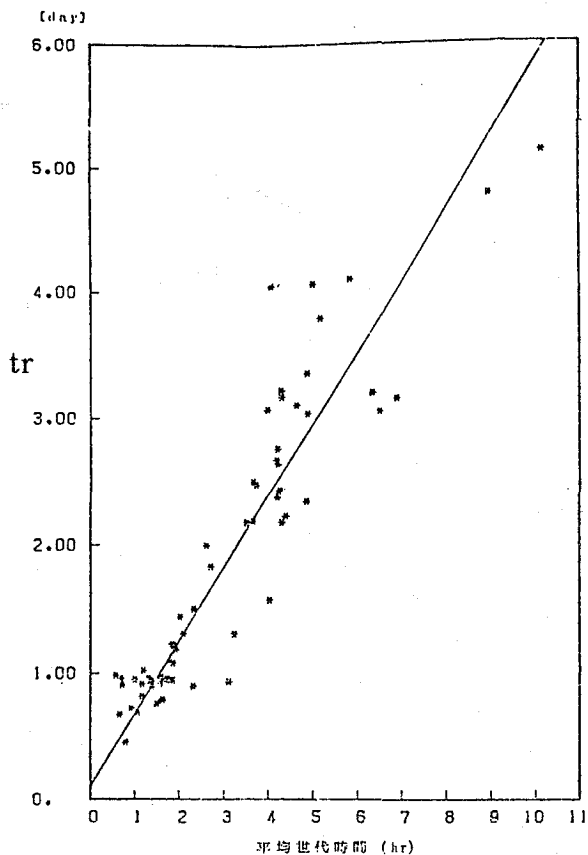


図7 平均世代時間とtrの相関図

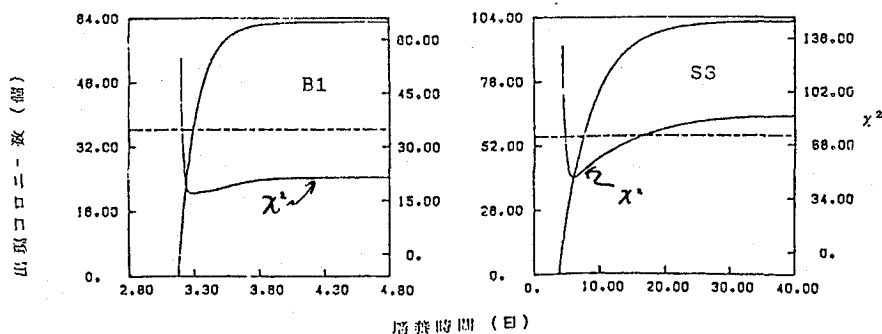


図8. 培養時間に伴う χ^2 値の変動

B1 (*Agromonas* sp.) S3 (畑土壌)

$$\chi^2 = \frac{(n-1) \cdot V}{\bar{x}}$$

n: データ数, V: 分散, \bar{x} : 平均

純粋培養された細菌、及び土壤中の細菌の、コロニー数を経時的に観察し χ 指標を検討した結果、 χ 指標は培養時間に伴い変化する統計量であることが明らかになった (図8)。更に、 χ 指標は培養初期に於いて極小値を示すことも見出された。この χ 指標の経時的変動の要因のひとつとして、 λ や t_r の並列平板間での変動 (図9) が考えられる。

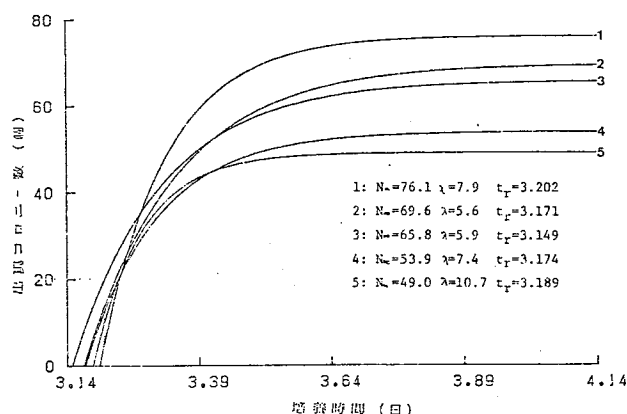


図9 平板毎のコロニー出現経過の違い

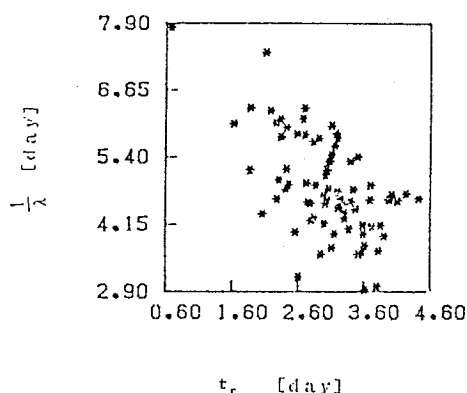


図10 t_r と $\frac{1}{\lambda}$ の相関図

水田土壌の例

次に、並列平板間の λ と t_r の関係を検討したところ、 $1/\lambda$ と t_r の間には負の相関関係が成立していることが認められた (図10)。なお、この関係は純粋培養した細菌、及び土壤中の細菌群、両者に共通して認められた。検討の結果、一般に並列平板間の t_r と $1/\lambda$ の間には負の相関関係が成立し、その結果として並列平板間のCF曲線が互いに交差することが見出された。また、そのために χ 指標には極小値が存在したものと考えられる。更に、Fisherの χ 指標は、培養時間の影響を受けない N_0 に対しては有効な手法であることが示された。

土壌試料の場合、並列平板間の N_0 は激しく変動し、 N_0 が著しく小さな平板の中には、 λ や t_r の推定値が他の平板と比較して異常に大きな平板や、CF曲線がFORモデルから系統だって離反している平板が観察された。前者に対応する平板では培養中期 (12日目) 以後、コロニー出現の突然の停止を呈し、後者に対応する平板では、スプレッド (拡散性コロニー) が平板を覆っていた。なお、上記のような異常と思われる平板を除いた残りの組について N_0 の分布を検討したところ、Poisson 分布の変動と同程度であることが確認された。

土壌のように多様な細菌種を含む試料の平板計数値は一般に変動が激しい。これらの変動する計数値の中で明らかに異常と認定される基準として、本研究より次の2点をあげることができる。①CF曲線のFORモデルからの系統だった離反、②パラメーター $\lambda \cdot tr$ の異常値、である。なお、この他の変動性の原因として、平板上に於ける細胞の増殖が肉眼で認めうるコロニー形成に至らずに中断する現象があげられる(Hattori)。

まとめ

- (1)細菌のコロニー出現の時間経過の解析を通して、コロニー形成のモデル(FORモデル)を導いた。
- (2)土壌中の細菌群のCF曲線は、数段の曲線から成り、各成分CF曲線は類似した増殖速度を持つ細菌グループと関連し、各グループの菌数の比率、及び増殖速度の違いはFORモデルにより説明できることを示した。
- (3)並列平板間のコロニー計数値の変動は、細菌個体の各平板への分配の問題に加えて、① λ や tr の平板間変動と、②スプレッドの出現によるFORモデルからの逸脱、あるいは $\lambda \cdot tr$ の異常値の問題があることを説明した。

審 査 結 果 の 要 旨

平板計数法は、土壤細菌の定量的研究にとって、もっとも有望な手法である可能性をもつにもかかわらず、その基礎的研究が充分でないため、これまでその有効性が発揮されてこなかった。本研究は、この基礎的研究に正面からとり組む事を目的としている。

第一章ではコロニー形成経過の検討を行っている。その特徴は、非常に短い時間間隔で、コロニーの出現の定量的追跡を行ない、その出現がランダムでポアソン則にしたがっていることを、明らかにしている点である。このことから、全培養時間を対象としたコロニー形成のマクロ的定式化を行っている。すなわち、コロニー数の増大は遅滞時間 t_r 後に開始される一次反応として表現され、その速度定数は n で表現される。

第2章では、上記コロニー形成式を土壤細菌に適用するための諸条件について検討を行なっている。ここでまず注目されるのは、多種類の構成をもつ土壤細菌のコロニー形成が、2内至3のコロニー形成曲線によって表現されるという事実である。すなわち、水田土壌では3つの、畑土壌では2つのコロニー形成曲線によって表現できる。このような単純化は、どのようにして実現するのかを単離菌株を中心に検討した結果、土壌中の細菌は特定培地上の増殖速度により、2内至3つのグループに大別されることを明らかにした。すなわち、この各グループが1つのコロニー形成曲線に対応するのである。

第3章では並列平板間におけるコロニー形成の変動を解明した。平板間におけるコロニー出現の変動性は培養初期に顕著な変化を示すが、後期には安定する傾向を示す。しかしスプレッダーなどの出現により、後期の安定性がくずれることがある。この場合、コロニー形成曲線にも異常が見出され、これを指針に異常性を論じうることを示した。

以上の成果は、土壤細菌の平板計数法の基礎確立への重要な貢献であり、農学博士の称号を授与するに価するものと考えらる。